

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68</b>		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/07238</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>27. Februar 1997 (27.02.97)</b>
 (21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP96/03580</b>  (22) Internationales Anmeldedatum: <b>13. August 1996 (13.08.96)</b>		 (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
 (30) Prioritätsdaten: 195 30 332.6 17. August 1995 (17.08.95) DE 195 30 333.4 17. August 1995 (17.08.95) DE 195 30 336.9 17. August 1995 (17.08.95) DE			
 (71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten außer US</i> ): <b>EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN</b> [DE/DE]; Universitätsklinikum, Geissweg 3, D-72076 Tübingen (DE).			
 (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): <b>EINSELE, Hermann</b> [DE/DE]; Käsenbachstrasse 28/3, D-72076 Tübingen (DE).			
 (74) Anwälte: <b>WITTE, Alexander usw.; Rotebühlstrasse 121, D-70178 Stuttgart (DE).</b>			
 (54) Title: <b>EXTRACTION, AMPLIFICATION AND SEQUENTIAL HYBRIDISATION OF FUNGUS CELL DNA AND A PROCESS FOR DETECTING FUNGUS CELLS IN CLINICAL MATERIAL</b>			
 (54) Bezeichnung: <b>EXTRAKTION, AMPLIFIKATION UND SEQUENTIELLE HYBRIDISIERUNG VON PILZZELLEN-DNA SOWIE VERFAHREN ZUM NACHWEISEN VON PILZZELLEN IN KLINISCHEM MATERIAL</b>			
 (57) Abstract			
<p>To detect fungi cells in clinical material, fungi DNA is extracted from whole blood, and the extracted fungi DNA is subsequently tested. This testing enables the conclusion to be drawn that there is a fungal infection. For further diagnosis, the species of fungi are subsequently determined from the extracted DNA. In this connection, the process for extracting the fungi DNA from whole blood involves isolation of essentially intact fungi cells from the whole blood and extraction of DNA from the isolated fungi cells. To detect the fungi DNA, at least one segment of the fungi DNA to be tested is amplified, and as a result the amplification products are detected, if necessary. To further identify the species of fungi, characterising nucleotide sequence sections are determined for the species of fungi.</p>			
 (57) Zusammenfassung			
<p>Zum Nachweisen von Pilzzellen in klinischem Material wird Pilz-DNA aus Vollblut extrahiert und die extrahierte Pilz-DNA dann nachgewiesen. Aufgrund dieses Nachweises kann auf eine Pilzinfektion geschlossen werden. Für die weitere Diagnose werden die Pilzspezies dann aus der extrahierten Pilz-DNA bestimmt. Das Verfahren zum Extrahieren der Pilz-DNA aus Vollblut umfasst dabei die Isolation überwiegend intakter Pilzzellen aus dem Vollblut und die Extraktion von DNA aus den isolierten Pilzzellen. Zum Nachweisen der Pilz-DNA wird dann zumindest ein Segment der nachzuweisenden Pilz-DNA amplifiziert, woraufhin die Amplifikationsprodukte gegebenenfalls nachgewiesen werden. Um die Pilzspezies weiter zu identifizieren, werden für die Pilzspezies kennzeichnende Nucleotidsequenzabschnitte bestimmt.</p>			

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LJ	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Maroktanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Extraktion, Amplifikation und sequentielle Hybridisierung  
von Pilzzellen-DNA sowie Verfahren zum Nachweisen von  
Pilzzellen in klinischem Material

Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein ein Verfahren zum Nachweisen von Pilzzellen in klinischem Material.

Derartige Verfahren sind aus der Praxis bekannt, sie beruhen standardmäßig auf einer Anzüchtung von Pilzspezies aus klinischem Material auf entsprechenden Nährmedien.

Durch diese Anzüchtung z.B. in Petrischalen und den Nachweis anhand der gewachsenen oder auch nicht gewachsenen Kolonien sind die Nachweisgeschwindigkeit sowie -empfindlichkeit insbesondere wegen des langsamen Wachstumes der Pilzspezies stark beeinträchtigt. Die Diagnose der invasiven Pilzinfektion wird daher häufig erst durch eine äußerst komplikationsträchtige Biopsie eines Organes oder sogar erst nach dem Tod des Patienten gestellt.

Das Interesse an Verfahren zum Nachweisen von Pilzzellen ist vor dem Hintergrund zu sehen, daß insbesondere in den letzten Jahren Pilzspezies als bedeutende nosokomiale Pathogene eine erhebliche Bedeutung für immunsupprimierte Patienten erlangt haben. Vor allem nach Knochenmarktransplantationen (KMT), aber auch nach Leber-, Nieren-, Pankreas-, Herz- und Herz-Lungen-Transplantationen haben invasive Pilzinfektionen erheblich zugenommen. So ist es z.B. im Jahr 1994 vor allem in französischen KMT-Zentren zu einer solchen Häufung vor allem von Aspergillusinfektionen gekommen, daß diese Zentren mehrere Monate geschlossen werden mußten.

Neben den organtransplantierten Patienten sind aber auch Patienten mit Krebserkrankung, vor allem nach Chemotherapie oder chirurgischen Eingriffen, Verbrennungspatienten sowie Patienten auf chirurgischen und neonatalen Intensivstationen zunehmend von invasiven Pilzinfektionen betroffen. Sobald es bei diesen Patientenkollektiven zu einer Beteiligung eines Organsystems oder gar mehrerer Organsysteme kommt, beträgt die Sterblichkeit an dieser infektiösen Komplikation zwischen 80 und 100 %.

Nur durch eine frühzeitige Diagnose kann hier der Behandlungserfolg verbessert werden. Wegen der mit den eingangs erwähnten

Standardnachweisverfahren verbundenen Nachteile werden intensive Bemühungen unternommen, eine frühzeitige Sicherung der Diagnose einer systemischen Pilzinfektion zu ermöglichen.

Neue, auf molekularbiologischen Verfahren beruhende Techniken haben zwar bei einer Reihe von anderen Erregern bereits eine sensitivere Diagnostik und damit teilweise auch ein frühzeitigeres Erkennen und Behandeln der Infektionserkrankungen ermöglicht, bei Pilzinfektionen war dies bisher jedoch noch nicht möglich.

Aus der Veröffentlichung "Detection of various fungal pathogens in blood samples" in: EBMT 1995, Vol. 15, Suppl. 2, März 1995, Abstract Book, Abstract 432, S. 103, ist es jedoch bereits bekannt, ein DNA-Segment eines Pilz-Genes mittels des PCR-Verfahrens zu amplifizieren, um eine Vielzahl von Pilz-Pathogenen im Blut zu identifizieren. Durch zusätzliche Hybridisierung mit speziesspezifischen Oligonukleotiden konnten ferner verschiedene Pilzspezies voneinander unterschieden werden.

Die wesentlichen Probleme des Nachweises von Pilzinfektionen mit Hilfe molekularbiologischer Techniken sind dabei auf die sehr komplexe Zusammensetzung der Pilzzellenwand zurückzuführen, die bisher zeitaufwendige aber auch teure Extraktionsverfahren erforderlich machen.

Ein weiteres Problem besteht darin, daß eine zunehmende Zahl von Pilzspezies bei den immunsupprimierten Patienten bedrohliche Infektionen auslösen kann, woraus die Notwendigkeit resultiert, eine Fülle von verschiedenen Pilzgattungen und -stämmen bei diesen Patienten erfassen und bestimmen zu müssen. Da sich die Therapie der Infektionen bei verschiedenen Pilzspezies nämlich unterscheidet, ist es folglich erforderlich, nicht nur alle

Pilzspezies erfassen, sondern diese auch differenzieren und identifizieren zu können.

Vor diesem Hintergrund ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, das eingangs erwähnte Verfahren dahingehend weiterzubilden, daß eine frühzeitige Diagnose einer Pilzinfektion möglich wird.

Das Verfahren soll dabei möglichst schnell und einfach durchzuführen sein, möglichst viele Pilzspezies erfassen und in einer Weiterbildung auch identifizieren können.

Das erfindungsgemäß gefundene Verfahren zum Nachweisen von Pilzzellen in klinischem Material umfaßt die Schritte:

- 1.) Extrahieren von Pilz-DNA aus Vollblut; und
- 2.) Nachweisen der extrahierten Pilz-DNA.

Durch die Abkehr von der bisher bekannten Anzüchtung von Pilzspezies aus klinischem Material und den Zugriff auf die Pilz-DNA selbst wird ein Verfahren geschaffen, das bei hoher Sensitivität über den Nachweis von pilzspezifischer DNA den sehr frühen Nachweis von Pilzinfektionen ermöglicht. Weil der Nachweis sozusagen auf der DNA-Ebene durchgeführt werden kann, lassen sich zumindest zum Teil hoch empfindliche, gut etablierte und schnell durchzuführende Verfahren einsetzen, so daß gegenüber dem bekannten Verfahren bezüglich Sensitivität und Geschwindigkeit große Vorteile erzielt werden. Dabei ist darauf zu achten, daß die Freisetzung und Reinigung der Pilz-DNA nicht nur rasch, sondern auch nahezu vollständig und relativ rein erfolgen muß, um eine hohe Sensitivität zu gewährleisten und eine schnelle Diagnose zu ermöglichen.

Darüber hinaus sollte das neue Verfahren für eine Vielzahl von Pilzspezies sensitiv sein, wobei mit möglichst wenigen Verfahrensschritten die Pilzspezies auch identifiziert werden sollten.

Diese weitere Aufgabe wird bei dem obengenannten neuen Verfahren durch den folgenden Verfahrensschritt erreicht, der zusätzlich oder anstelle des Verfahrensschrittes 2.) durchgeführt wird:

3.) Bestimmen der Pilzspezies aus der extrahierten Pilz-DNA.

Dieses Verfahren hat den weiteren Vorteil, daß die Diagnose der spezifischen Pilzinfektion auf der DNA-Ebene sehr rasch durchzuführen ist und eine hohe Spezifität aufweist, da z. B. bekannte Sequenzierverfahren verwendet werden können.

Bei den einzelnen Schritten des neuen Verfahrens waren viele Probleme zu überwinden, die sich zum Teil aus der Zusammensetzung der Pilzzellenwand und aus der Tatsache ergaben, daß ein Großteil der Pilzzellen sich nicht im Vollblut frei in Lösung sondern nach Phagozytose in verschiedenen Blutzellpopulationen befindet, vor allem in Granulozyten und Makrophagen.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist daher auch isoliert der erste Verfahrensschritt, also die Extraktion von Pilz-DNA aus Vollblut. Dieses Verfahren wird zwar vorteilhaft in der Diagnostik eingesetzt, um eine Pilzinfektion bei einem Patienten nachweisen zu können, es findet aber auch dort Anwendung, wo Pilz-DNA für anderweitige Weiterverarbeitung benötigt wird.

Mit dem neuen Verfahren kann dafür z. B. Pilz-DNA aus dem Blut von Tieren gewonnen werden, die speziell mit den interessierenden Pilzspezies infiziert wurden. Aus der so gewonnenen Pilz-DNA können z. B. DNA-Sonden herausgeschnitten werden, die für

Nachweisreaktionen verwendet oder in Plasmide eingebaut werden können. Es sind dabei Anwendungen im ganzen Bereich der Grundlagenforschung, Diagnostik, Therapeutik, industriellen Gentechnologie etc. denkbar.

Das Verfahren der Extraktion von Pilz-DNA soll dabei insbesondere für die Diagnostik auch bei sehr geringen Mengen von Pilzen in dem vorliegenden Vollblut noch zuverlässig Pilz-DNA extrahieren können. Ferner soll dieser Verfahrensschnitt schnell und so einfach durchgeführt werden, daß er auch im Klinikalltag und ggf. von angelerntem Personal angewendet werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß der Schritt des Extrahierens von Pilz-DNA aus Vollblut die Schritte umfaßt:

- a) Isolation überwiegend intakter Pilzzellen aus dem Vollblut; und
- b) Extraktion von DNA aus den isolierten Pilzzellen.

Die der Erfindung zugrunde liegende Aufgabe wird auf diese Weise vollkommen gelöst. Das neue Verfahren besteht jetzt sozusagen aus zwei Stufen, wobei in der ersten Stufe Pilzzellen aus dem Vollblut isoliert werden und dann in der zweiten Stufe die DNA aus diesen isolierten Pilzzellen extrahiert wird, um mit Hilfe dieser extrahierten DNA dann Pilzinfektionen nachweisen und ggf. spezifizieren zu können. Dieses zweistufige Verfahren erhöht vor allem die Spezifität, da ggf. störende, anderweitige DNA in dem zweiten Verfahrensschritt nur noch in geringem Maße vorhanden ist.

Dabei ist es dann bevorzugt, wenn das Verfahren folgende Verfahrensschritte umfaßt:

- a1) Aufschließen der im Vollblut befindlichen Blutzellen;
- a2) Isolation überwiegend intakter Pilzzellen von zellulärer DNA;
- b1) Aufschließen der isolierten Pilzzellen; und
- b2) Isolation der Pilz-DNA.

Auf diese Weise wird eine sehr schnelle und sichere Trennung der Pilz-DNA von zellulärer DNA erreicht. Durch den Aufschluß der im Vollblut befindlichen Blutzellen wird nämlich in dieser Ausgangslösung die zelluläre DNA freigesetzt, woraufhin dann die durch das bisherige Aufschlußverfahren noch nicht oder zumindest noch nicht vollständig aufgeschlossenen Pilzzellen durch schnelle und einfache Verfahren, wie z.B. eine Zentrifugation von der freien zellulären DNA getrennt werden können. Bei dem daraufhin folgenden Aufschließen der so isolierten Pilzzellen kann mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, daß sich keine oder nur noch unerhebliche Mengen an zellulärer DNA in der Lösung befindet. Das im Schritt a1) durchzuführende Aufschließen der Blutzellen muß folglich so erfolgen, daß die Pilzzellen noch nicht lysiert werden. Da die Pilzzellwand deutlich komplexer ist als die Zellwand von Blutzellen, kann dies durch geeignete vorsichtige Aufschlußverfahren sichergestellt werden.

Der Verfahrensschritt a1) hat jedoch noch einen weiteren Vorteil, durch ihn werden nämlich ggf. phagozytierte Pilzzellen wieder

freigesetzt, so daß insbesondere für die Diagnostik auch noch sehr geringe Mengen von Pilzen in dem vorliegenden Vollblut extrahiert werden können. Bei dem neuen Verfahren ist es nämlich nicht mehr erforderlich, daß zumindest einige Pilzzellen in dem Vollblut frei in Lösung sind, es reicht völlig aus, wenn einige wenige Pilzzellen nach Phagozytose z.B. in Granulozyten oder Makrophagen vorliegen.

Dabei ist es insbesondere bevorzugt, wenn im Schritt a) folgende Schritte durchgeführt werden:

- a1.1) Lysis der roten Blutkörperchen durch osmotische Hämolyse;
- a1.2) enzymatisches Aufschließen der weißen Blutkörperchen; und
- a2.1) Zentrifugation des so behandelten Vollblutes und Verwendung des Pellet in den nächsten Verfahrensschritten.

Hier ist von Vorteil, daß in den Schritten a1.1) und a1.2) zwar zuverlässig die Blutzellen aufgeschlossen werden, die Pilzzellen selbst jedoch noch nicht beschädigt sind. Durch die folgende Zentrifugation ist dann eine sehr sichere Trennung zwischen der inzwischen freigesetzten zellulären DNA der Blutzellen und Zellbruchstücken der Blutzellen einerseits sowie noch überwiegend intakten Pilzzellen andererseits möglich. Auf diese Weise wird außerdem sichergestellt, daß keine Pilz-DNA verlorengeht, da diese noch in den im Pellet zu findenden Pilzzellen vorhanden ist. Zusammengefaßt liegen die Vorteile der obigen Schritte also darin, daß zum einen auch geringste Konzentrationen von Pilzzellen erfaßt werden und daß zum anderen die isolierte Pilz-

DNA allenfalls gering mit zellulärer DNA verunreinigt ist, so daß eine hohe Sensitivität und Spezifität bei den nachfolgenden diagnostischen Schritten möglich ist, da das Verhältnis von Pilz- zu zellulärer DNA zugunsten der Pilz-DNA deutlich verbessert wurde.

In einer Weiterbildung ist es dann bevorzugt, wenn im Schritt b) folgende Schritte durchgeführt werden:

b1.1) alkalisches Lysieren und enzymatische Behandlung der Pilzzellen.

Es hat sich herausgestellt, daß durch diese einfachen Verfahrensschritte ein sicheres Aufschließen der Pilzzellen möglich ist, die aus dem Pellet des Verfahrensschrittes a2.1) wieder aufgenommen wurden.

Weiterhin ist es bevorzugt, wenn im Schritt a1.1) die Lysis der roten Blutkörperchen mit Hilfe einer hypotonen Lösung erfolgt, vorzugsweise mit einer Endkonzentration von ca. 10 mM Tris pH 7,6, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, und 10 mM NaCl, und wenn im Schritt a1.2) das enzymatische Aufschließen der weißen Blutkörperchen in einer Lösung mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml Proteinase K, 10 mM Tris pH 7,6, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl und 0,2 % SDS erfolgt.

In einer Weiterbildung wird die Lösung aus Schritt a1.2) für 100-140 min, vorzugsweise 120 min bei 60-70°C, vorzugsweise bei 65°C inkubiert.

Es wurde gefunden, daß auf diese Weise die Blutzellen zuverlässig und vollständig aufgeschlossen werden können, wobei eine Beschädigung der Pilzzellen vermieden wird, so daß nach diesen

Verfahrensschritten sowohl die in dem Ausgangsblut frei in Lösung befindlichen als auch die phagozytierten Pilzzellen relativ unbeschädigt vorliegen und abzentrifugiert werden können, ohne ihre DNA dabei zu verlieren.

Ferner ist es bevorzugt, wenn der Schritt b1.1) die folgenden Schritte umfaßt:

- Inkubieren der im Pellet aus Schritt a2.1) befindlichen Pilzzellen bei 90-98°C, vorzugsweise 95°C für 5-15 min, vorzugsweise 10 min, in einer Lösung mit 50 mM NaOH,
- Neutralisation mit 1 M Tris-HCl pH 7,0,
- Enzymatische Behandlung mit Zymolyase für 50-70 min, vorzugsweise 60 min bei 30-40°C, vorzugsweise 37°C,
- Proteindenaturierung durch Inkubation mit Tris/EDTA bei 60-70°C, vorzugsweise 65°C, für 10-30 min, vorzugsweise 20 min.

Es wurde gefunden, daß durch diese Verfahrensschritte ein sicheres Aufschließen der Pilzzellen mit daraufhin erfolgender vollständiger Freigabe der Pilz-DNA möglich ist, so daß die Pilz-DNA nunmehr frei in Lösung ist und von den Zellbruchstücken der Pilzzellen isoliert werden kann.

Dabei ist es bevorzugt, wenn in diesem Zusammenhang der Schritt b2) folgende Schritte umfaßt:

- Proteinpräzipitation mit 5 M Kaliumazetat, und
- DNA-Präzipitation des Überstandes in eiskaltem Isopropanol.

Diese Verfahrensschritte sind sehr einfach durchzuführen, zunächst wird durch Zugabe von Kaliumazetat das Protein herausgefällt, dann der Überstand abgenommen und mit eiskaltem

Isopropanol versetzt, so daß die DNA ausfällt. Diese ausgefallene DNA kann dann für die weiteren Verfahrensschritte herangezogen werden, also zum Nachweis und zur Identifizierung einer Pilzinfektion dienen.

Bei dem insoweit beschriebenen Verfahren ist also zusammengefaßt als erstes von Vorteil, daß die Pilzspezies sozusagen an Hand ihrer DNA allgemein nachgewiesen und dann speziell identifiziert werden kann. Die Pilz-DNA wird dabei nicht direkt aus dem Vollblut extrahiert, sondern zunächst erfolgt eine Trennung der Pilzzellen von zellulärer DNA, um die Sensitivität und Spezifität des Nachweises zu erhöhen. Mit anderen Worten, wenn nur sehr wenige Pilzzellen in dem Vollblut vorhanden sind, so könnte die daraus extrahierte sehr geringe Pilz-DNA-Menge ggf. vor dem Hintergrund der in sehr hoher Konzentration vorliegenden zellulären DNA nicht nachgewiesen werden, so daß die erwähnte Trennung hier große Vorteile bezüglich der Sensitivität bringt.

Ein weiterer Vorteil bei dem neuen Verfahren liegt darin, daß auch phagozytierte Pilzzellen für den Nachweis zur Verfügung stehen, da zunächst die Blutzellen des Vollblutes aufgeschlossen werden, ohne daß dabei die Pilzzellen, seien sie frei in Lösung oder in phagozytiertem Zustand, beschädigt werden. Erst nach Abtrennung der Pilzzellen von der zellulären DNA und den verbleibenden Zelltrümmern der Blutzellen werden dann die Pilzzellen aufgeschlossen. Das hierzu verwendete Verfahren ist in der Lage, trotz der sehr komplexen Pilzzellwände für einen vollständigen Aufschluß zu sorgen, ohne daß dabei die Pilz-DNA zerstört wird.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist ebenfalls ein Kit zur Durchführung des oben beschriebenen Verfahrens. Ein derartiges Kit kann eine Zusammenstellung sämtlicher Stammlösungen

enthalten, wie sie für die genannten Verfahrensschritte im einzelnen benötigt werden. Es ist jedoch auch möglich, in diesem Kit nur die nicht üblicherweise in einem Labor vorrätigen Stammlösungen vorzusehen, so daß bspw. auf die Tris-Puffer etc. verzichtet werden kann, aber zumindest die Proteinase K und die Zymolyase in dem Kit vorhanden sind.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist auch isoliert oder in Verbindung mit dem oben beschriebenen ersten Verfahrensabschnitt der zweite Verfahrensabschnitt, also der Nachweis der extrahierten Pilz-DNA. Die nachzuweisende Pilz-DNA wird dabei vorteilhafterweise so extrahiert bzw. isoliert, wie es oben beschrieben ist. Es ist jedoch auch möglich, die Pilz-DNA z. B. durch geeignete Dichtegradienten-Zentrifugation, spezifische Fällungsschritte mit DNA-Sonden etc. zu gewinnen.

In all diesen Fällen ist der Nachweis wünschenswert, ob in der nun vorliegenden Ausgangslösung für die weitere Verwendung auch tatsächlich Pilz-DNA enthalten ist.

Die Pilz-DNA wird zwar vorteilhaft zum Zwecke der Diagnostik von Pilzinfektionen herangezogen, sie kann jedoch auch anderweitig weiterverarbeitet werden. Die Pilz-DNA kann dafür über Agarplatten oder aus dem Blut von Tieren gewonnen werden, die speziell mit den interessierenden Pilzspezies infiziert wurden. Aus der so gewonnenen Pilz-DNA können z. B. DNA-Sonden herausgeschnitten werden, die für Nachweisreaktionen verwendet oder in Plasmide eingebaut werden können. Es sind dabei Anwendungen im ganzen Bereich der Grundlagenforschung, Diagnostik, Therapeutik, industriellen Gentechnologie etc. denkbar.

Durch den neuen Nachweisschritt sollen dabei in einem einzigen Verfahren möglichst viele verschiedene Pilzspezies auch bei

sehr geringer Konzentration in der Ausgangslösung erfaßt werden können, so daß z. B. im Rahmen der Diagnostik sehr schnell und sehr frühzeitig eine Aussage möglich ist, ob überhaupt eine Pilzinfektion vorliegt. Das neue Verfahren soll darüber hinaus schnell und so einfach durchzuführen sein, daß es auch im Klinikalltag angewendet und ggf. von angelerntem Personal durchgeführt werden kann.

Erfnungsgemäß wird diese Aufgabe dadurch gelöst, daß der Schritt des Nachweises der extrahierten Pilz-DNA die folgenden Schritte umfaßt:

- c) Amplifikation zumindest eines Segmentes der isolierten Pilz-DNA; und
- d) ggf. Nachweis der Amplifikationsprodukte.

Es stehen eine ganze Reihe auch standardmäßig verfügbarer Verfahren bereit, mit denen auch geringe Mengen einer isolierten DNA zunächst hochverstärkt und dann nachgewiesen werden können. Diese Verfahren sind hochspezifisch und sehr sensitiv, so daß sie die gewünschten Eigenschaften für Diagnostik, Therapeutik, industrielle Gentechnologie etc. mit sich bringen. Darüber hinaus sind diese Verfahren auch ggf. von angelerntem Personal durchzuführen.

Die Amplifikation kann dabei mittels PCR, Klonierung, DNA-abhängigen DNA-Polymerasen etc. erfolgen, wobei der Nachweis über Gelelektrophorese, optische Dichte, Anfärben mit spezifisch an Nukleinsäure bindenden Markern etc. erfolgen kann.

In einer Weiterbildung erfolgt die Amplifikation dann mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von zwei

Primern, die an die DNA von einer Vielzahl von verschiedenen Pilzspezies binden, vorzugsweise an das Pilz-Gen für die 18Ssu-rRNA.

Hier ist von Vorteil, daß auf einfache und inzwischen etablierte Weise DNA in ausreichender Menge erzeugt werden kann, die dann leicht nachzuweisen, aber auch weiterverwendet werden kann, um die betreffenden Pilzspezies zu identifizieren.

Dabei ist es dann bevorzugt, wenn im Schritt c) als Primer die Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll verwendet werden.

Der Erfinder der vorliegenden Anmeldung hat nämlich überraschenderweise gefunden, daß diese beiden Nucleotidsequenzen als Primer für die verschiedensten Pilzspezies verwendbar sind, die im Klinikalltag relevant sind. Durch Verwendung dieser beiden Primer in der PCR-Reaktion werden Verstärkungsprodukte erzeugt, die eine Länge von ca. 500 Basenpaaren haben und somit auch leicht weiterzuverarbeiten sind, da sie z.B. leicht über Gelelektrophorese nachgewiesen werden können. Auf diese Weise ergibt sich also ein identisches Nachweisverfahren für alle pathogenen Pilzspezies, da gefunden wurde, daß die beiden Primersequenzen an die verschiedene Pilz-DNA binden.

Dabei ist es bevorzugt, wenn die Polymerase-Kettenreaktion mit folgendem Zyklus durchgeführt wird:

- c1) Denaturieren für 0,3-1 min, vorzugsweise für 0,5 min bei 90-96°C, vorzugsweise bei 94°C;
- c2) Hybridisieren für 0,5-1,5 min, vorzugsweise für 1,0 min bei 58-64°C, vorzugsweise bei 62°C, und

- c3) Extension für 1,5-2,5 min, vorzugsweise für 2,0 min bei 68-75°C, vorzugsweise bei 72°C.

Dabei ist es bevorzugt, wenn vor Beginn der Zyklusschritte ein Denaturierungsschritt von 5-9 min, vorzugsweise von 3 min bei 90-96°C, vorzugsweise bei 94°C erfolgt.

Es wurde gefunden, daß mit den obigen Bedingungen die PCR-Reaktion sehr reproduzierbar und vor allem hochspezifisch abläuft, so daß sichergestellt ist, daß die Amplifikationsprodukte auch tatsächlich Segmente der ursprünglichen Pilz-DNA sind.

Weiter ist es bevorzugt, wenn im Schritt d) die Amplifikationsprodukte gelelektrophoretisch, vorzugsweise auf einem Agarosegel, nachgewiesen werden und dazu vorzugsweise mit Ethidiumbromid angefärbt werden.

Hier ist von Vorteil, daß ein bekanntes und gut etabliertes Nachweisverfahren verwendet wird, um aufzeigen zu können, daß bei der PCR-Reaktion tatsächlich Amplifikationsprodukte entstanden sind, die auf eine Pilzinfektion hinweisen.

Weiter ist es dann bevorzugt, wenn eine DNA-Sequenz aus dem Pilz-Gen für die 18ssu-rRNA amplifiziert wird.

Der Erfinder der vorliegenden Anmeldung hat nämlich erkannt, daß dieses Pilz-Gen bei den verschiedenen Pilz-Stämmen und -Gattungen ein derartiges Sequenzsegment aufweist, das einerseits von zwei Bindungsregionen für Primer flankiert wird, die für alle Pilz-Stämme und -Gattungen identisch sind, daß aber andererseits die Sequenz dieses Segmentes für die verschiedenen Pilz-Stämme und -Gattungen so verschieden ist, daß sie zum

Nachweis der einzelnen Pilzspezies und -Gattungen verwenden werden kann.

Die Erfindung betrifft ferner die Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 aus dem beigefügten Sequenzprotokoll. Dabei ist es bevorzugt, wenn diese Nucleotidsequenzen zum Amplifizieren eines Segmentes von Pilz-DNA verwendet werden.

Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zum Nachweisen von Pilz-DNA in einer Untersuchungslösung, wobei dieser Kit an die DNA von einer Vielzahl von Pilzspezies bindende Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion enthält. Vorzugsweise enthält dieser Kit als Primer die Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 aus dem Sequenzprotokoll.

Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zur Durchführung des oben erwähnten Verfahrens.

Bei einem derartigen Kit ist von Vorteil, daß sämtliche erforderlichen Lösungen und insbesondere die erforderlichen Primer zusammengestellt werden, so daß sie für Routineverfahren verwendet werden können. So ist es zum Beispiel im Laboralltag möglich, auf diese neuen Kits zurückzugreifen, um in vorliegenden Untersuchungslösungen Pilzspezies überhaupt nachzuweisen zu können. Ferner kann dieser Kit dazu verwendet werden, bestimmte Segmente der nachgewiesenen Pilzspezies hochzuverstärken, die dann bspw. für weitere Identifizierungsverfahren verwendet werden können.

Gemäß der vorliegenden Anmeldung ist auch isoliert oder zusammen mit den oben beschriebenen Verfahrensabschnitten 1 und 2 der dritte Verfahrensabschnitt, also die Bestimmung der Pilzspezies anhand der extrahierten und bereits nachgewiesenen Pilz-DNA.

Die Bestimmung der Pilzspezies soll dabei insbesondere für die Diagnostik schnell und so einfach durchzuführen sein, daß sie auch im Klinikalltag und ggf. von angelerntem Personal durchgeführt werden kann.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß folgender zusätzlicher Schritt durchgeführt wird:

- e) Bestimmen von für die Pilzspezies kennzeichnenden Nucleotidsequenzabschnitten der in der Untersuchungslösung enthaltenen DNA.

Da das Nachweisverfahren auf DNA-Ebene durchgeführt wird, ist es völlig ausreichend, wenn bestimmte Segmente der Pilz-DNA bestimmt werden, sofern diese Segmente für die Pilzspezies jeweils spezifisch ist. Dabei kann auf Standardverfahren zurückgegriffen werden, indem zumindest teilweise die Amplifikationsprodukte sequenziert oder ansequenziert werden, das Schmelzverhalten der Doppelstränge untersucht wird, etc.

Diese Verfahren sind in der Regel so schnell und einfach durchzuführen, daß sie auch von angelerntem Personal vorgenommen werden können.

Dabei ist es bevorzugt, wenn im Schritt e) die Pilz-DNA oder Segmente der Pilz-DNA mit DNA-Sonden hybridisiert werden, die für bestimmte Pilzstämme und/oder -spezies spezifisch sind, wobei der Test der erfolgten Hybridisierung damit zur Identifizierung der Pilzspezies führt.

Hier ist von Vorteil, daß ein sehr schnell und einfach durchzuführendes Hybridisierungsverfahren zum Nachweis verwendet wird. Hier werden spezifische Sonden eingesetzt, die für die jeweiligen Pilzspezies spezifisch sind, so daß sie ausschließlich an die amplifizierten Segmente dieser Pilzspezies binden. Derartige Verfahren lassen sich z.B. auf Gelen durchführen, wobei die Hybride dann durch Anfärben kenntlich gemacht werden. Ein weiteres Verfahren besteht darin, die optisch unterschiedlichen Verhaltensweisen von Einzelsträngen und doppelsträngigen Regionen, z.B. in der optischen Dichte, im Dichroismus oder ähnlichem auszunutzen.

Weiter ist es bevorzugt, wenn zum Testen der erfolgten Hybridisierung die Sonden mit Digoxigenin markiert und die Hybride z.B. nach der Southern Blot-Methode nachgewiesen werden.

Durch diesen Schritt vereinfacht sich das Verfahren noch einmal, die Sonden selbst sind bereits mit dem entsprechenden Marker versehen, der mit einem bekannten Verfahren nach der Hybridisierung durch eine vorteilhafterweise sogar visuell zu erkennende Farbstoffreaktion die Hybridbildung anzeigt.

Dabei ist es bevorzugt, wenn als DNA-Sonden eine oder mehrere der Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 bis SEQ ID-No: 8 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll verwendet werden, wobei die DNA-Sonden vorzugsweise sequentiell nacheinander in der Reihenfolge SEQ ID-No: 3, SEQ ID-No: 8, SEQ ID-No: 6, SEQ ID-No: 7, SEQ ID-No: 4 und SEQ ID-No: 5 eingesetzt werden und jeweils die Hybridisierung getestet wird.

Durch dieses sequentielle Hybridisieren können die einzelnen Pilzspezies in der Reihenfolge ihrer Häufigkeit getestet werden, so daß sich das Nachweisverfahren deutlich beschleunigen läßt.

Die Erfindung betrifft ferner eine der Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 - SEQ ID-No: 8 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.

Die Erfindung betrifft ferner eine Verwendung einer oder mehrerer dieser Nucleotidsequenzen als DNA-Sonde zum Identifizieren von Pilzspezies.

Hier ist von Vorteil, daß durch die 6 angegebenen Nucleotidsequenzen spezifisch sämtliche klinisch interessierenden Pilzspezies voneinander unterschieden werden können.

Die Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 3 dient dabei zum Nachweis der Pilzspezies *Candida albicans*, SEQ ID-No: 4 zum Nachweis von *Candida glabrata*, SEQ ID-No: 5 zum Nachweis von *Candida krusei*, SEQ ID-No: 6 zum Nachweis von *Candida tropicalis*, SEQ ID-No: 7 zum Nachweis von *Candida parapsilosis* und SEQ ID-No: 8 zum Nachweis von Pilzspezies der Gattung *Aspergillus*, wobei insbesondere *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. nidulans* und *A. terreus* nachgewiesen werden.

Die Erfindung betrifft ferner einen Kit zum Identifizieren von Pilzspezies, der an spezifische Nucleotidsequenzabschnitte der DNA der jeweiligen Pilzspezies hybridisierende DNA-Sonden enthält. Vorzugsweise enthält der Kit als DNA-Sonden eine oder mehrere der Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 - SEQ ID-No: 8 aus dem Sequenzprotokoll.

Ferner betrifft die Erfindung einen Kit zur Durchführung des gesamten oben genannten Verfahrens.

Hier ist von Vorteil, daß ein derartiger Kit entweder nur mit den DNA-Sonden oder aber zusätzlich mit weiter erforderlichen Lösungen bereitgestellt werden kann, so daß im Laboralltag

sämtliche erforderlichen Stammlösungen etc. direkt aus diesem Kit genommen werden können. Dadurch vereinfacht sich der Nachweis, bzw. die Identifizierung der jeweiligen Pilzspezies erheblich, da die einzelnen Stammlösungen nicht mehr gesondert im Labor hergestellt werden müssen. Es kann aber auch möglich sein, in diesen Kit nur die Sonden und ggf. die Primer und Enzyme/Stammlösungen für die Polymerase-Kettenreaktion aufzunehmen, so daß im übrigen auf standardmäßig vorhandene Stammlösungen zurückgegriffen wird.

Ein die oben im einzelnen beschriebenen Verfahrensschritte in vorteilhafter Weise zusammenfassendes Verfahren zum Nachweisen von Pilzzellen in Vollblut umfaßt die Schritte:

- Isolation überwiegend intakter Pilzzellen aus dem Vollblut,
- Extrahieren von DNA aus den isolierten Pilzzellen,
- Amplifikation zumindest eines Segmentes der extrahierten Pilz-DNA, vorzugsweise zumindest eines Segmentes des Pilz-Gens für die 18ssu-rRNA,
- Nachweis der Amplifikationsprodukte in Form einer Ja/Nein-Entscheidung, und
- Zuordnung der Amplifikationsprodukte zu einzelnen Pilz-Spezies durch Hybridisierung mit DNA-Sonden, die für bestimmte Pilzstämme und/oder -spezies spezifisch sind.

Ein großer Vorteil dieses zusammengefaßten Verfahrens liegt darin, daß nur ein Amplifikationsschritt erforderlich ist, durch den ein Segment der Pilz-DNA, vorzugsweise ein Segment des Pilz-Gens für die 18ssu-rRNA derart hochverstärkt wird, daß diese

Amplifikationsprodukte sowohl für die JA/Nein-Entscheidung als auch für die Bestimmung der Pilz-Spezies herangezogen werden können. Der Erfinder der vorliegenden Anmeldung hat nämlich erkannt, daß das Pilz-Gen für die 18ssu-rRNA einerseits zumindest abschnittweise durch zwei Primer flankiert werden kann, die für alle interessierenden Pilz-Spezies identisch sind, während das Amplikon andererseits für die verschiedenen Pilz-Spezies unterschiedlich ist, so daß es mit verschiedenen Sonden hybridisiert werden kann, die für die Pilz-Spezies kennzeichnend sind.

Mit anderen Worten, ein einziger Amplifikationsschritt reicht aus, um sowohl die Frage beantworten zu können, ob überhaupt eine Pilz-Infektion vorliegt, als auch die Frage, um welche Pilz-Spezies es sich handelt. Dieses Verfahren ist somit extrem einfach und leicht durchzuführen, Spezialkenntnisse sind nicht erforderlich, so daß auch angelerntes Personal eingesetzt werden kann.

Weitere Vorteile ergeben sich aus der nachstehenden Beschreibung.

Es versteht sich, daß die vorstehend genannten und die nachstehend noch zu erläuternden Merkmale nicht nur in den jeweils angegebenen Kombinationen, sondern auch in anderen Kombinationen oder in Alleinstellung verwendbar sind, ohne den Rahmen der vorliegenden Erfindung zu verlassen.

Beispiele für die Durchführung der einzelnen Verfahrensschritte sowie die Anwendung des Verfahrens im Rahmen eines klinischen Untersuchungsprogrammes sind in der folgenden Beschreibung angegeben.

Ein besonderer Vorteil des neuen Verfahrens liegt darin, daß es mit Vollblut durchgeführt wird, daß also z.B. keine Biopsie erforderlich ist oder noch herzustellendes Serum verwendet wird. Mit dem Vollblut wird zunächst eine Trennung der Pilzzellen von zellulärer DNA vorgenommen. Dies ist erforderlich, damit die ggf. nur in geringer Menge vorliegende Pilz-DNA nicht vor dem Hintergrund der in sehr viel höherer Konzentration vorhandenen zellulären DNA nachgewiesen werden muß. Dadurch wird also die Spezifität des Nachweisverfahrens erhöht. Zu diesem Zweck werden als erstes die roten Blutkörperchen durch osmotische Hämolyse lysiert und dann die weißen Blutkörperchen enzymatisch aufgeschlossen. Diese beiden Verfahrensschritte sind so ausgewählt, daß durch sie die Pilzzellen selbst noch nicht beschädigt werden und daß ggf. phagozytierte Pilzzellen unbeschädigt wieder freigesetzt werden, so daß auch sie für den weiteren Nachweis zur Verfügung stehen.

Beispiel 1: Lysis roter Blutkörperchen durch osmotische Hämolyse.

Die Lysis der roten Blutkörperchen erfolgt mit Hilfe einer hypotonen Lösung. Dazu wird folgender Puffer mit folgenden Endkonzentrationen verwendet:

Tris pH 7,6	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaCl	10 mM

Die Lösung wird für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, und danach zentrifugiert.

Für diesen ersten Schritt ist eine Menge von 3 ml Vollblut ausreichend.

Beispiel 2:           Enzymatisches Aufschließen weißer Blutkörperchen

Die weißen Blutkörperchen, die ggf. Pilzzellen enthalten, werden vorsichtig aufgebrochen, indem die Zellen mit Proteinase K (200 µg/ml) der Firma Boehringer, Mannheim in folgendem Puffer mit den angegebenen Endkonzentrationen enzymatisch angedaut werden, in dem das Pellet aus Beispiel 1 aufgenommen wird:

Tris pH 7,6	10 mM
EDTA pH 8,0	10 mM
NaCl	50 mM
SDS	0,2 %
Proteinase K	200 µg/ml

Dieser Puffer wird für zwei Stunden bei 65°C inkubiert.

Beispiel 3:           Trennung überwiegend intakter Pilzzellen vor allem von zellulärer DNA

Nachdem wie in den Beispielen 1 und 2 angegeben die Blutzellen aufgeschlossen wurden, so daß die zelluläre DNA freigegeben wurde, erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 5000 Umdrehungen/min, der zu einem erheblichen Verlust an zellulärer DNA führt, die bei dieser Zentrifugationsgeschwindigkeit nicht sedimentiert.

Im Sediment befinden sich jetzt vollständig die freien oder freigesetzten Pilzzellen, die für die weitere Verarbeitung in einem Puffer (Aqua bidest) aufgenommen werden..

Beispiel 4: Aufschließen der Pilzzellen

Als nächstes werden die Pilzzellen alkalisch lysiert und enzymatisch behandelt, um die Pilz-DNA freizusetzen.

Dazu erfolgt zunächst eine Alkalilysye mit 200 ml 50 mM NaOH für 10 min bei 95°C.

Daraufhin erfolgt ein Neutralisationsschritt mit 1 M Tris-HCl pH 7,0.

Als nächstes werden 500 µl Zymolyase von Sigma (300 µg/ml) zugegeben und die Lösung für 60 min bei 37°C inkubiert, um die Pilzzellen enzymatisch aufzuschließen.

Daraufhin werden 500 µl Tris/EDTA und 50 µl 10%iger SDS Lösung zugegeben und das Gemisch bei 65°C für 20 min inkubiert, um das Protein zu denaturieren.

Beispiel 5: Isolation der Pilz-DNA

In der nunmehr vorliegenden Lösung befinden sich Trümmer der Pilzzellen sowie freie Pilz-DNA, die nun isoliert werden muß.

Hierzu erfolgt zunächst eine Proteinpräzipitation mit 5 M Kaliumazetat, woraufhin der Überstand abgenommen und die DNA dann durch Zugabe von eiskaltem Isopropanol ausgefällt wird. Dieses Fällungsprodukt wird dann für die weiteren Verfahrensschritte verwendet.

Durch die in den Beispielen 1 - 5 angegebenen Verfahrensschritte ist es also möglich, aus Vollblut hoch-selektiv Pilz-DNA zu extrahieren, die nun als Präzipitat vorliegt und nur gering

mit zellulärer DNA verunreinigt ist, wodurch der jetzt erfolgende Nachweis sehr sensitiv und hochspezifisch erfolgen kann.

Beispiel 6:                   Amplifikation eines pilzspezifischen DNA-Segmentes

In diesem Verfahrensschritt soll zunächst nachgewiesen werden, ob in dem Präzipitat aus dem Verfahrensschritt in Beispiel 5 überhaupt Pilz-DNA vorhanden ist. Dabei wird ausgenutzt, daß die im Sequenzprotokoll unter SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 angegebenen DNA-Sequenzen spezifisch an Bindungsstellen auf dem Pilz-Gen für die 18Ssu-rRNA vieler Pilzstämme und -spezies binden.

Der Erfinder der vorliegenden Anmeldung hat nämlich erkannt, daß dieses Pilz-Gen bei den verschiedenen Pilz-Stämmen und -Gattungen ein derartiges Sequenzsegment aufweist, das einerseits von zwei Bindungsregionen für Primer flankiert wird, die für alle Pilz-Stämme und -Gattungen identisch sind, daß aber andererseits die Sequenz dieses Segmentes für die verschiedenen Pilz-Stämme und -Gattungen so verschieden ist, daß sie gleichzeitig zum Nachweis der einzelnen Pilzspezies und -Gattungen verwendet werden kann.

Die DNA-Sequenz SEQ ID-No: 1 bindet dabei an den sense-Strang, während die DNA-Sequenz SEQ ID-No: 2 an den anti-sense-Strang bindet, wobei der Abstand zwischen den beiden Bindungsstellen ca. 500 Basenpaare beträgt. Diese beiden DNA-Sequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 eignen sich damit als Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR), in der folglich Verstärkungsprodukte (Amplicon) mit einer Länge von ca. 500 Basenpaaren erzeugt werden.

In der nachfolgenden Tabelle 1 ist die Lage der Primer und die Länge des jeweiligen Amplicons angegeben.

Tabelle 1: Von Pilz-Pathogenen erhaltene Amplicons

Pilzspezies	Bindungsstellen der Primer Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Länge des Amplicons
C. albicans	bp544-563	bp1033-1014	bp490
C. glabrata	bp546-565	bp1047-1028	bp502
C. krusei	bp535-554	bp1016-997	bp482
C. tropicalis	bp544-563	bp1030-1011	bp487
C. parapsilosis	bp544-563	bp1033-1014	bp490
A. fumigatus	bp544-563	bp1046-1027	bp503
A. niger	bp483-502	bp986 - 967	bp503
A. flavus	bp483-502	bp985 - 966	bp502
A. terreus	bp481-500	bp984 - 965	bp503
A. nidulans	bp481-500	bp984 - 965	bp503

Durch diese beiden Primer SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 lassen sich also für alle relevanten Pilzspezies der Gattungen Candida und Aspergillus durch das PCR-Verfahren Amplicons von ca. 500 Basenpaaren in ausreichender Menge herstellen.

Die PCR-Bedingungen sind dabei die folgenden:

Puffer (50 µl):

10 mM Tris pH 9,6

50 mM NaCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

0,2 mg/ml BSA

Polymerase

je 0,5 mM Nukleotide

je 100 pM Primer

Anfängliche Denaturierung: 3 min bei 94°C

Zyklus-Denaturierung: 0,5 min bei 94°C

Annealing: 1 min bei 62°C

Extension: 2 min bei 72°C

Terminale Extension: 5 min bei 72°C

Zykluszahl: 34

Die hohe Magnesiumkonzentration im Puffer sorgt für eine hohe Spezifität der Polymerase, die mit 72°C im Extensions-Schritt bei ihrem Temperaturoptimum arbeiten kann.

Mit diesen Primern konnten insgesamt 40 Stämme von *Candida albicans*, 10 Stämme von *Candida tropicalis*, 6 Stämme von *Candida parapsilosis*, 11 Stämme von *Candida glabrata*, 8 Stämme von *Candida krusei*, 8 Stämme von *Aspergillus fumigatus*, 6 Stämme von *Aspergillus flavus*, 5 Stämme von *Aspergillus terreus*, 7 Stämme von *Aspergillus niger*, 5 Stämme von *Aspergillus nidulans* und 3 Stämme von *Aspergillus versicolor* erfolgreich amplifiziert werden.

Beispiel 7: Nachweis der Amplifikationsprodukte aus Beispiel 6

Im nächsten Schritt soll jetzt nachgewiesen werden, ob bei der PCR-Reaktion aus Beispiel 6 auch tatsächlich DNA-Segmente mit einer Länge von ca. 500 Basenpaaren hochverstärkt wurden. Diese Detektion der pilzspezifischen DNA-Segmente erfolgt durch Ethidiumbromid-Färbung der spezifischen Bande in einem 2%igen Agarose-Gel.

Ist hier die spezifische Bande zu erkennen, so kann von einer Pilzinfektion ausgegangen werden, da die Primer SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 an alle oben erwähnten Pilzstämme binden. Sollte also durch die Verfahrensschritte aus den Beispielen 1 - 5 Pilz-DNA extrahiert worden sein, so wird sie durch den PCR-Schritt des Beispiels 6 so weit hochverstärkt, daß sie hier durch Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen werden kann.

Beispiel 8:

Zuordnung der Amplifikationsprodukte aus Beispiel 6 zu einzelnen Pilzspezies

Für eine spezifische Therapie ist es jetzt noch erforderlich, die im Schritt 7 bereits nachgewiesene Pilzinfektion genauer zu spezifizieren. Hier zeigt sich jetzt ein weiterer Vorteil des PCR-Schrittes aus Beispiel 6. Dort wurde nämlich so viel pilzspezifisches DNA-Segment erzeugt, daß jetzt weitere Nachweisverfahren zur Bestimmung der Pilzspezies möglich sind.

Hierzu werden die im Sequenzprotokoll angegebenen Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 bis SEQ ID-No: 8 herangezogen, die als Spezies-spezifische Sonden dienen, die mit einem Sequenzabschnitt des in Beispiel 6 erzeugten DNA-Segmentes spezifisch hybridisieren.

Es wurde gefunden, daß die Sonde SEQ ID-No: 3 mit *Candida albicans*, SEQ ID-No: 4 mit *Candida glabrata*, SEQ ID-No: 5 mit *Candida krusei*, SEQ ID-No: 6 mit *Candida tropicalis*, SEQ ID-No: 7 mit *Candida parapsilosis* und SEQ ID-No: 8 mit *Aspergillus fumigatus*, *A. flavus*, *A. versicolor*, *A. niger*, *A. nidulans* und *A. terreus* hybridisieren. Die Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 8 ist also eine allgemeine *Aspergillus*-Sonde, während die Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 - SEQ ID-No: 5 Pilzspezies der Gattung *Candida* voneinander unterscheiden können.

Um die erfolgte Hybridisierung nachweisen zu können, werden die Sonden mit dem Transferase-Kit der Firma Boehringer, Mannheim mit Digoxigenin markiert, wobei der Nachweis nach dem Southern Blot-Verfahren mit der üblichen Farbreaktion erfolgt.

Mit Hilfe dieser Sonden erfolgt eine sequentielle Hybridisierung, die nach der Häufigkeit der einzelnen Pilzspezies gestaffelt

ist, so daß zunächst mit SEQ ID-No: 3 (*C. albicans*), dann mit SEQ ID-No: 8 (*Aspergillus*), SEQ ID-No: 6 (*C. tropicalis*), SEQ ID-No: 7 (*C. parapsilosis*), SEQ ID-No: 4 (*C. glabrata*) und schließlich mit SEQ ID-No: 5 (*C. krusei*) hybridisiert wird.

Auf diese Weise ist es also möglich, an Hand der im Schrittbeispiel 6 erzeugten Amplifikationsprodukte durch sequentielles Hybridisieren die Pilzspezies zu identifizieren und anschließend eine gezielte Therapie einzuleiten.

Beispiel 9:                    Nachweis ausgesäter Pilzzellen in Blut

Mit Hilfe der spezifischen Amplifikation und sequentiellen Hybridisierung gelang es, Pilzspezies mit einer Sensitivität von 1 - 3 Pilzzellen reproduzierbar nachzuweisen. Durch Aussaat von Pilzspezies in Blutproben konnte nachgewiesen werden, daß das obige Verfahren eine Sensitivität von einer sog. CFU (colony forming unit)/ml-Blut erreicht. Diese Nachweisgrenze liegt weit unterhalb derjenigen, die bei einer klinisch relevanten Pilzaussaat in Blut erwartet werden kann.

Beispiel 10:                    Klinisches Untersuchungsprogramm

In einem groß angelegten klinischen Untersuchungsprogramm konnte eine hohe Spezifität des neuen Verfahrens bei der Analyse von 165 Blutproben von 65 gesunden Probanden gezeigt werden. Alle 165 Blutproben sind negativ geblieben.

94 immunsupprimierte Patienten mit unklarem Fieber wurden daraufhin auf die Präsenz einer Pilzinfektion untersucht. Von 69 Patienten, bei denen keine invasive Pilzinfektion vorlag, waren weit über 200 Blutproben (bis auf eine Ausnahme) ebenfalls negativ.

Dagegen konnten alle 25 Patienten mit invasiver Pilzinfektion bereits innerhalb der ersten Woche als positiv identifiziert werden. Bei allen Patienten gelang darüber hinaus die Zuordnung zu dem verursachenden Pilzerreger.

**SEQUENZPROTOKOLL****ALLGEMEINE ANGABEN:****ANMELDER:**

NAME: Eberhard-Karls-Universität Tübingen,  
Universitätsklinikum  
STRASSE: Geissweg 3  
ORT: Tübingen  
LAND: Deutschland  
POSTLEITZAHL: 72076  
TELEFON: 07071-29-1  
TELEFAX: 07071-293966

BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Extraktion von Pilzzellen-DNA

ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

**COMPUTERLESBARE FASSUNG:**

DATENTRÄGER: (folgt)  
COMPUTER:  
BETRIEBSSYSTEM:  
SOFTWARE:

**DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:**

ANWALTSAKTE: 5402P102

**ANGABEN ZU SEQ ID-NO:1:**

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:  
LÄNGE: 20 Basenpaare  
ART: Nucleinsäure  
STRANGFORM: Einzelstrang  
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

**SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:1:**

ATTGGAGGGC AAGTCTGGTG

20

32

## ANGABEN ZU SEQ ID-NO:2:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:  
LÄNGE: 20 Basenpaare  
ART: Nucleinsäure  
STRANGFORM: Einzelstrang  
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

## SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:2:

CCGATCCCTA GTCGGCATAG

20

## ANGABEN ZU SEQ ID-NO:3:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:  
LÄNGE: 30 Basenpaare  
ART: Nucleinsäure  
STRANGFORM: Einzelstrang  
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

## SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:3:

TCTGGGTAGC CATTATGGC GAACCAGGAC

30

## ANGABEN ZU SEQ ID-NO:4:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:  
LÄNGE: 30 Basenpaare  
ART: Nucleinsäure  
STRANGFORM: Einzelstrang  
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

## SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:4:

TTCTGGCTAA CCCCAAGTCC TTGTGGCTTG

30

## ANGABEN ZU SEQ ID-NO:5:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:  
LÄNGE: 30 Basenpaare  
ART: Nucleinsäure  
STRANGFORM: Einzelstrang  
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

## SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:5:

GTCTTCCTT CTGGCTAGCC TCGGGCGAAC

30

## ANGABEN ZU SEQ ID-NO:6:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:  
LÄNGE: 30 Basenpaare  
ART: Nucleinsäure  
STRANGFORM: Einzelstrang  
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

## SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:6:

GTTGGCCGGT CCATCTTCT GATGCGTACT

30

## ANGABEN ZU SEQ ID-NO:7:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:  
LÄNGE: 30 Basenpaare  
ART: Nucleinsäure  
STRANGFORM: Einzelstrang  
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

## SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:7:

TTTCCTTCTG GCTAGCCTTT TTGGCGAAC

30

34

ANGABEN ZU SEQ ID-NO:8:

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:  
LÄNGE: 30 Basenpaare  
ART: Nucleinsäure  
STRANGFORM: Einzelstrang  
TOPOLOGIE: linear

HYPOTHETISCH: JA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID-NO:8:

CATGGCCTTC ACTGGCTGTG GGGGGAACCA

30

Patentansprüche

1. Verfahren zum Nachweisen von Pilzzellen in klinischem Material, gekennzeichnet durch die Schritte:
  - 1) Extrahieren von Pilz-DNA aus Vollblut; und
  - 2) Nachweisen der extrahierten Pilz-DNA.
2. Verfahren nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch den zusätzlich oder an Stelle des Schrittes 2) durchzuführenden Schritt
  - 3) Bestimmen der Pilz-Spezies aus der extrahierten DNA.
3. Verfahren zum Extrahieren von Pilz-DNA aus Vollblut, vorzugsweise durchzuführen im Zusammenhang mit dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, gekennzeichnet durch die Schritte:
  - a) Isolation überwiegend intakter Pilzzellen aus dem Vollblut; und
  - b) Extrahieren von DNA aus den isolierten Pilzzellen.
4. Verfahren nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Schritte umfaßt:
  - a1) Aufschließen der im Vollblut befindlichen Blutzellen;
  - a2) Isolation überwiegend intakter Pilzzellen von zellulärer DNA;
  - b1) Aufschließen der isolierten Pilzzellen; und
  - b2) Isolation der Pilz-DNA.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt a) die Schritte umfaßt:
  - a1.1) Lysis der roten Blutkörperchen durch osmotische Hämolyse;

- a1.2) enzymatisches Aufschließen der weißen Blutkörperchen; und
  - a2.1) Zentrifugation des so behandelten Vollblutes und Verwendung des Pellet in den nächsten Verfahrensschritten.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 - 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt b1) den Schritt umfaßt:
- b1.1) Alkalisches Lysieren und enzymatische Behandlung der Pilzzellen.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt a1.1) die Lysis der roten Blutkörperchen mit Hilfe einer hypotonen Lösung und einem Detergenz erfolgt, vorzugsweise mit einer Endkonzentration von 10 mM Tris pH 7,6, 5 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 mM NaCl.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt a1.2) das enzymatische Aufschließen der weißen Blutkörperchen in einer Lösung mit einer Endkonzentration von 200 µg/ml Proteinase K, 10 mM Tris pH 7,6, 10 mM EDTA pH 8,0, 50 mM NaCl und 0,2 % SDS erfolgt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung für 100 - 140 min, vorzugsweise 120 min bei 60-70°C, vorzugsweise bei 65°C inkubiert wird.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 - 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt b1.1) folgende Schritte umfaßt:
  - Inkubieren der im Pellet aus Schritt a2.1) befindlichen Pilzzellen bei 90-98°C, vorzugsweise 95°C für 5-15 min, vorzugsweise 10 min, in einer Lösung mit 50 mM NaOH,

- Neutralisation mit 1 M Tris-HCl pH 7,0,
  - enzymatische Behandlung mit Zymolyase für 50-70 min, vorzugsweise 60 min bei 30-40°C, vorzugsweise 37°C,
  - Proteindenaturierung durch Inkubation mit Tris/EDTA bei 60-70°C, vorzugsweise 65°C für 10-30 min, vorzugsweise 20 min.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 - 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Schritt b2) folgende Schritte umfaßt:
    - Proteinpräzipitation mit 5 M Kaliumazetat, und
    - DNA-Präzipitation des Überstandes in eiskaltem Isopropanol.
  12. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 11.
  13. Kit nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß er Proteinase K und Zymolyase enthält.
  14. Verfahren zum Nachweisen von Pilz-DNA in einer Untersuchungslösung, vorzugsweise durchzuführen im Zusammenhang mit dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11, gekennzeichnet durch die Schritte:
    - c) Amplifikation zumindest eines Segmentes der nachzuweisenden Pilz-DNA; und
    - d) ggf. Nachweis der Amplifikationsprodukte.
  15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt c) eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit der Untersuchungslösung durchgeführt wird, wobei an die DNA von einer Vielzahl von Pilzspezies bindende Primer verwendet werden.
  16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt c) als Primer an das Pilz-Gen für die 18Ssu-rRNA bindende Nucleotidsequenzen verwendet werden.

17. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt c) als Primer die Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 1 und SEQ ID-No: 2 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll verwendet werden.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 17, dadurch gekennzeichnet, daß die Polymerase-Kettenreaktion mit folgendem Zyklus durchgeführt wird:
  - c1) Denaturieren für 0,3-1 min, vorzugsweise für 0,5 min bei 90-96°C, vorzugsweise bei 94°C;
  - c2) Hybridisieren für 0,5-1,5 min, vorzugsweise für 1,0 min bei 58-64°C, vorzugsweise bei 62°C; und
  - c3) Extension für 1,5-2,5 min, vorzugsweise für 2,0 min bei 68-75°C, vorzugsweise bei 72°C.
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß vor Beginn der Zyklusschritte ein Denaturierungsschritt von 5-9 min, vorzugsweise von 3 min bei 90-96°C, vorzugsweise bei 94°C erfolgt.
20. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 - 19, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt d) die Amplifikationsprodukte gelektrophoretisch, vorzugsweise auf einem Agarosegel, nachgewiesen und dazu vorzugsweise mit Ethidiumbromid eingefärbt werden.
21. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 - 20, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz aus dem Pilz-Gen für die 18ssu-rRNA amplifiziert wird.
22. Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 1 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
23. Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 2 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.

24. Verwendung der Nucleotidsequenzen nach Anspruch 22 und/oder Anspruch 23 zum Amplifizieren eines Segmentes von Pilz-DNA.
25. Verwendung der Nucleotidsequenzen nach Anspruch 22 und/oder Anspruch 23 als Primer bei einem Verfahren nach einem der Ansprüche 14 - 21.
26. Kit zum Nachweisen von Pilz-DNA in einer Untersuchungslösung, dadurch gekennzeichnet, daß er an die DNA von einer Vielzahl von Pilzspezies bindende Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion enthält.
27. Kit nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß er als Primer die Nucleotidsequenzen aus Anspruch 21 und/oder Anspruch 22 enthält.
28. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 - 21.
29. Verfahren zum Identifizieren von Pilzspezies, vorzugsweise durchzuführen im Zusammenhang mit dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder 14 bis 21, gekennzeichnet durch den zusätzlichen Schritt:
  - e) Bestimmen von für die Pilzspezies kennzeichnenden Nucleotidsequenzabschnitten der in der Untersuchungslösung enthaltenen DNA.
30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß im Schritt e) die Pilz-DNA oder Segmente der Pilz-DNA, die ggf. zuvor gemäß Schritt c) amplifiziert wurden, mit DNA-Sonden hybridisiert werden, die für bestimmte Pilzstämme und/oder -spezies spezifisch sind, wobei der Test der erfolgten Hybridisierung dann zur Identifizierung der Pilzspezies führt.

31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß zum Testen der erfolgten Hybridisierung die Sonden mit Digoxigenin markiert und die Hybride z.B. nach der Southern Blot-Methode nachgewiesen werden.
32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß als DNA-Sonden eine oder mehrere der Nucleotidsequenzen SEQ ID-No: 3 bis SEQ ID-No: 8 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll verwendet werden.
33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA-Sonden sequentiell nacheinander, vorzugsweise in der Reihenfolge SEQ ID-No: 3, SEQ ID-No: 8, SEQ ID-No: 6, SEQ ID-No: 7, SEQ ID-No: 4 und SEQ ID-No: 5 eingesetzt werden und jeweils die Hybridisierung getestet wird.
34. Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 3 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
35. Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 4 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
36. Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 5 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
37. Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 6 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
38. Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 7 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.
39. Nucleotidsequenz SEQ ID-No: 8 aus dem beiliegenden Sequenzprotokoll.

40. Verwendung einer oder mehrerer der Nucleotidsequenzen aus den Ansprüchen 34 - 39 als DNA-Sonde zum Identifizieren von Pilzspezies.
41. Verwendung einer oder mehrerer der Nucleotidsequenzen aus den Ansprüchen 34 - 39 als DNA-Sonde bei einem Verfahren nach einem der Ansprüche 29 - 33.
42. Verwendung der Nucleotidsequenz aus Anspruch 34 zum Nachweis der Pilzspezies *Candida albicans*.
43. Verwendung der Nucleotidsequenz aus Anspruch 35 zum Nachweis der Pilzspezies *Candida glabrata*.
44. Verwendung der Nucleotidsequenz aus Anspruch 36 zum Nachweis der Pilzspezies *Candida krusei*.
45. Verwendung der Nucleotidsequenz aus Anspruch 37 zum Nachweis der Pilzspezies *Candida tropicalis*.
46. Verwendung der Nucleotidsequenz aus Anspruch 38 zum Nachweis der Pilzspezies *Candida parapsilosis*.
47. Verwendung der Nucleotidsequenz aus Anspruch 39 zum Nachweis von Pilzspezies der Gattung *Aspergillus*.
48. Kit zum Identifizieren von Pilzspezies, dadurch gekennzeichnet, daß er an spezifische Nucleotidsequenzabschnitte der DNA der jeweiligen Pilzspezies hybridisierende DNA-Sonden enthält.
49. Kit nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, daß er als DNA-Sonden eine oder mehrere der Nucleotidsequenzen aus den Ansprüchen 34 - 39 enthält.

50. Kit nach Anspruch 48, dadurch gekennzeichnet, daß er als DNA-Sonden an das Pilz-Gen für die 18ssu-rRNA bindende Nucleotidsequenzen enthält.
51. Verfahren zum Nachweisen von Pilzzellen in Vollblut, mit den Schritten:
  - Isolation überwiegend intakter Pilzzellen aus dem Vollblut,
  - Extrahieren von DNA aus den isolierten Pilzzellen,
  - Amplifikation zumindest eines Segmentes der extrahierten Pilz-DNA, vorzugsweise zumindest eines Segmentes des Pilz-Gens für die 18ssu-rRNA,
  - Nachweis der Amplifikationsprodukte in Form einer Ja/Nein-Entscheidung, und
  - Zuordnung der Amplifikationsprodukte zu einzelnen Pilz-Spezies durch Hybridisierung mit DNA-Sonden, die für bestimmte Pilzstämme und/oder -spezies spezifisch sind.
52. Verfahren nach Anspruch 51 und einem der Ansprüche 1 bis 11 oder 14 bis 21 oder 30 bis 33.
53. Kit zur Durchführung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 51 oder 52.
54. Kit nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß er an das Pilz-Gen der 18ssu-rRNA bindende Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion sowie DNA-Sonden enthält, die für bestimmte Pilzstämme und/oder -spezies spezifisch sind und an das jeweilige Pilz-Gen für die 18ssu-rRNA binden.

PCT

WELTOORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : <b>C12Q 1/68, G01N 33/50</b>		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 97/07238</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: <b>27. Februar 1997 (27.02.97)</b>
(21) Internationales Aktenzeichen: <b>PCT/EP96/03580</b>			(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) Internationales Anmeldedatum: 13. August 1996 (13.08.96)			
(30) Prioritätsdaten: 195 30 332.6 17. August 1995 (17.08.95) DE 195 30 333.4 17. August 1995 (17.08.95) DE 195 30 336.9 17. August 1995 (17.08.95) DE			<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): <b>EBERHARD-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN</b> (DE/DE); Universitätsklinikum, Geissweg 3, D-72076 Tübingen (DE).			(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: <b>17. Juli 1997 (17.07.97)</b>
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): <b>EINSELE, Hermann</b> (DE/DE); Käsenbachstrasse 28/3, D-72076 Tübingen (DE).			
(74) Anwälte: <b>WITTE, Alexander usw.; Rotebühlstrasse 121, D-70178 Stuttgart (DE).</b>			
<p>(54) Title: EXTRACTION, AMPLIFICATION AND SEQUENTIAL HYBRIDISATION OF FUNGUS CELL DNA AND A PROCESS FOR DETECTING FUNGUS CELLS IN CLINICAL MATERIAL</p> <p>(54) Bezeichnung: EXTRAKTION, AMPLIFIKATION UND SEQUENTIELLE HYBRIDISIERUNG VON PILZZELLEN-DNA SOWIE VERFAHREN ZUM NACHWEISEN VON PILZZELLEN IN KLINISCHEM MATERIAL</p> <p>(57) Abstract</p> <p>To detect fungi cells in clinical material, fungus DNA is extracted from whole blood, and the extracted fungus DNA is subsequently tested. This testing enables the conclusion to be drawn that there is a fungal infection. For further diagnosis, the species of fungus are subsequently determined from the extracted DNA. In this connection, the process for extracting the fungus DNA from whole blood involves isolation of essentially intact fungus cells from the whole blood and extraction of DNA from the isolated fungus cells. To detect the fungus DNA, at least one segment of the fungus DNA to be tested is amplified, and as a result the amplification products are detected, if necessary. To further identify the species of fungus, characterising nucleotide sequence sections are determined for the species of fungus.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Zum Nachweisen von Pilzzellen in klinischem Material wird Pilz-DNA aus Vollblut extrahiert und die extrahierte Pilz-DNA dann nachgewiesen. Aufgrund dieses Nachweises kann auf eine Pilzinfektion geschlossen werden. Für die weitere Diagnose werden die Pilzspezies dann aus der extrahierten Pilz-DNA bestimmt. Das Verfahren zum Extrahieren der Pilz-DNA aus Vollblut umfasst dabei die Isolation überwiegend intakter Pilzzellen aus dem Vollblut und die Extraktion von DNA aus den isolierten Pilzzellen. Zum Nachweisen der Pilz-DNA wird dann zumindest ein Segment der nachzuweisenden Pilz-DNA amplifiziert, woraufhin die Amplifikationsprodukte gegebenenfalls nachgewiesen werden. Um die Pilzspezies weiter zu identifizieren, werden für die Pilzspezies kennzeichnende Nucleotidsequenzabschnitte bestimmt.</p>			

#### ***LEDIGLICH ZUR INFORMATION***

**Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.**

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estonia	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal Application No  
PCT/EP 96/03580

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 6 C12Q1/68 G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 23568 A (HOLMES ANN RACHEL ; CANNON RICHARD DAVID (NZ); JENKINSON HOWARD FRA) 25 November 1993	1-4, 12-15,28
Y	see page 24, line 6 - page 26, line 15; claims 41,67-83; examples 4-6 ---	5-11
X	EP 0 422 869 A (GENE TRAK SYSTEMS) 17 April 1991 see the whole document ---	1,2, 14-54
X	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, vol. 32, no. 1, January 1994, WASHINGTON, US, pages 228-231, XP000645486 HOLMES ET AL.: "Detection of C. albicans and other yeasts in blood by PCR" see page 228 - page 229 ---	1-4, 12-15,28
	-/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

4

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report

26 May 1997

09.06.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Molina Galan, E

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No
PCT/EP 96/03580

## C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 426 026 A (JORDAN ET AL.) 20 June 1995  see the whole document ---	1-3, 12-21, 26-31, 48,50-53
X	US 5 434 048 A (SIMON LUC ET AL) 18 July 1995  Seq. Id. 12 see the whole document ---	1,2, 14-22, 24-33, 40-54
X	EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4 October 1989 see the whole document ---	29-32, 37,48-54
Y	WO 92 08807 A (HRI RESEARCH) 29 May 1992 see page 18, line 30 - page 23, line 28; claims 30-42 ---	5-11
Y	EP 0 574 267 A (GEN-PROBE INC) 15 December 1993 see the whole document ---	5-11
A	US 4 130 395 A (CHRYSSANTHOU) 19 December 1978 see column 1, line 36 - line 39 ---	5,7
A	EP 0 285 439 A (GEN-PROBE INC.) 5 October 1988 ---	
A	US 5 426 027 A (LOTT ET AL.) 20 June 1995 ---	
X	BONE MARROW TRANSPLANTATION, 13 March 1994, page 184 XP000645489 EINSELE H ET AL: "DETECTION OF VARIOUS FUNGAL PATHOGENS IN BLOOD SAMPLES BY PCR" see abstract ---	1,2, 14-21, 26-31, 48,50-53
P,X	JP 08 089 254 A (TOYOUBOU JIIN ANARISHISU:KK) 9 April 1996  see claims -----	1,2, 14-21, 26-35, 40,41, 48-54

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP 96/03580

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. Claims 1, 2, 28 partly, and claims 3-13
2. Claims 1, 2, 28 partly, and claims 14- 54

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Internat'l Application No

PCT/EP 96/03580

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9323568 A	25-11-93	AU 4094293 A		13-12-93
		CA 2136206 A		25-11-93
		EP 0642588 A		15-03-95
EP 0422869 A	17-04-91	AU 6390590 A		18-04-91
		CA 2025180 A		13-04-91
		JP 3206900 A		10-09-91
		US 5403710 A		04-04-95
US 5426026 A	20-06-95	NONE		
US 5434048 A	18-07-95	CA 2086136 A		24-06-94
EP 0335633 A	04-10-89	AT 122103 T		15-05-95
		DE 68922428 D		08-06-95
		DE 68922428 T		25-01-96
		JP 2150300 A		08-06-90
WO 9208807 A	29-05-92	US 5284940 A		08-02-94
		AU 9058091 A		11-06-92
		EP 0557448 A		01-09-93
		US 5620852 A		15-04-97
EP 574267 A	15-12-93	AU 668746 B		16-05-96
		AU 4535593 A		04-01-94
		CA 2137690 A		23-12-93
		JP 8501208 T		13-02-96
		WO 9325711 A		23-12-93
US 4130395 A	19-12-78	NONE		
EP 285439 A	05-10-88	AT 111160 T		15-09-94
		AU 619745 B		06-02-92
		AU 1622388 A		02-11-88
		CA 1317860 A		18-05-93
		DE 3851354 D		13-10-94
		DE 3851354 T		19-01-95
		EP 0586024 A		09-03-94
		ES 2058263 T		01-11-94
		JP 1503006 T		12-10-89

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

Internat'l Application No  
PCT/EP 96/03580

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 285439 A		WO 8807539 A US 5364763 A	06-10-88 15-11-94
US 5426027 A	20-06-95	NONE	
JP 08089254 A	09-04-96	NONE	

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Ies Aktenzeichen  
PCT/EP 96/03580

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 6 C12Q1/68 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)  
IPK 6 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 93 23568 A (HOLMES ANN RACHEL ;CANNON RICHARD DAVID (NZ); JENKINSON HOWARD FRA) 25.November 1993	1-4, 12-15,28
Y	siehe Seite 24, Zeile 6 - Seite 26, Zeile 15; Ansprüche 41,67-83; Beispiele 4-6	5-11
X	EP 0 422 869 A (GENE TRAK SYSTEMS) 17.April 1991 siehe das ganze Dokument	1,2, 14-54
X	JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Bd. 32, Nr. 1, Januar 1994, WASHINGTON, US, Seiten 228-231, XP000645486 HOLMES ET AL.: "Detection of C. albicans and other yeasts in blood by PCR" siehe Seite 228 - Seite 229	1-4, 12-15,28
		-/-

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- \* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :  
 \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist  
 \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist  
 \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)  
 \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht  
 \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- \*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist  
 \*V\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden  
 \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindenscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist  
 \*&\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

4

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
26.Mai 1997	09.06.97
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter  Molina Galan, E

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat' des Aktenzeichen  
PCT/EP 96/03580

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 426 026 A (JORDAN ET AL.) 20.Juni 1995  siehe das ganze Dokument ---	1-3, 12-21, 26-31, 48,50-53
X	US 5 434 048 A (SIMON LUC ET AL) 18.Juli 1995  Seq. Id. 12 siehe das ganze Dokument ---	1,2, 14-22, 24-33, 40-54
X	EP 0 335 633 A (INTEGRATED GENETICS INC) 4.Oktober 1989 siehe das ganze Dokument ---	29-32, 37,48-54
Y	WO 92 08807 A (HRI RESEARCH) 29.Mai 1992 siehe Seite 18, Zeile 30 - Seite 23, Zeile 28; Ansprüche 30-42 ---	5-11
Y	EP 0 574 267 A (GEN-PROBE INC) 15.Dezember 1993 siehe das ganze Dokument ---	5-11
A	US 4 130 395 A (CHRYSSANTHOU) 19.Dezember 1978 siehe Spalte 1, Zeile 36 - Zeile 39 ---	5.7
A	EP 0 285 439 A (GEN-PROBE INC.) 5.Oktober 1988 ---	
A	US 5 426 027 A (LOTT ET AL.) 20.Juni 1995 ---	
X	BONE MARROW TRANSPLANTATION, 13.März 1994, Seite 184 XP000645489 EINSELE H ET AL: "DETECTION OF VARIOUS FUNGAL PATHOGENS IN BLOOD SAMPLES BY PCR" siehe Zusammenfassung ---	1,2, 14-21, 26-31, 48,50-53
P,X	JP 08 089 254 A (TOUYOUBOU JIIN ANARISHISU:KK) 9.April 1996  siehe Ansprüche -----	1,2, 14-21, 26-35, 40,41, 48-54

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/03580

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
  
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. Ansprüche 1,2,28 teilweise, und Ansprüche 3-13
2. Ansprüche 1,2,28 teilweise, und Ansprüche 14-54

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
  
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat' les Aktenzeichen

PCT/EP 96/03580

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9323568 A	25-11-93	AU 4094293 A CA 2136206 A EP 0642588 A	13-12-93 25-11-93 15-03-95
EP 0422869 A	17-04-91	AU 6390590 A CA 2025180 A JP 3206900 A US 5403710 A	18-04-91 13-04-91 10-09-91 04-04-95
US 5426026 A	20-06-95	KEINE	
US 5434048 A	18-07-95	CA 2086136 A	24-06-94
EP 0335633 A	04-10-89	AT 122103 T DE 68922428 D DE 68922428 T JP 2150300 A	15-05-95 08-06-95 25-01-96 08-06-90
WO 9208807 A	29-05-92	US 5284940 A AU 9058091 A EP 0557448 A US 5620852 A	08-02-94 11-06-92 01-09-93 15-04-97
EP 574267 A	15-12-93	AU 668746 B AU 4535593 A CA 2137690 A JP 8501208 T WO 9325711 A	16-05-96 04-01-94 23-12-93 13-02-96 23-12-93
US 4130395 A	19-12-78	KEINE	
EP 285439 A	05-10-88	AT 111160 T AU 619745 B AU 1622388 A CA 1317860 A DE 3851354 D DE 3851354 T EP 0586024 A ES 2058263 T JP 1503006 T	15-09-94 06-02-92 02-11-88 18-05-93 13-10-94 19-01-95 09-03-94 01-11-94 12-10-89

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung die zur selben Patentfamilie gehören

Internat'les Aktenzeichen

PCT/EP 96/03580

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 285439 A		WO 8807539 A US 5364763 A	06-10-88 15-11-94
US 5426027 A	20-06-95	KEINE	
JP 08089254 A	09-04-96	KEINE	